



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

# **BIOAKTIVNE SASTAVNICE HRANE I TUMORI**

SEMINARSKI RAD

Amel Zulji  
Preddiplomski studij molekularne biologije

Mentor:  
Nada Oršoli

Zagreb, 2014.

## Sažetak

*U ovom preglednom radu su opisani mehanizmi nastanka tumora odnosno onkogeni, tumor – supresorski geni i microRNA te mutacije u njima koje dovode do nastanka tumora. Opisane su pojedine sastavnice hrane, propolis i pripadni polifenoli te njihov preventivni kao i antitumorski u inak na razli itim animalnim modelima. Ispitivanjem flavanoida pokazalo se da oni tako er mogu djelovati preventivno kao i izravno pokazuju i antitumorski u inak, tako er se mogu kombinirati sa standardnim kemoterapeuticima pri emu znatno poboljšavaju krajnji ishod lije enja malignih oboljenja. Opisan je kvercetin i njegov neuroprotektivni u inak na kulturama stanice neurona P19. Krizin, naringenin i njihov pozitivni u inak na oksidativni stres kao i sprije avanje osteoporoze su tako er opisani.*

## Abstract

*In this review are described mechanisms of tumor formation or oncogenes, tumor – suppressor genes and microRNA genes and mutations in them which lead to occurrence of tumors. Here are also described the various components of food, propolis and associated polyphenols and their preventive as well as antitumor effect on various animal models. Flavanoids examinations showed that they may also act preventively and curatively demonstrating the antitumor effect and may be also combining with standard chemotherapeutics wherby considerably improves the outcome of treatment of malignant disease. Quercetin has been described and its neuroprotective effect to the cell cultures of neurons P19. Chrysin, naringenin and their possitive effect on oxidative stress as well as prevention of osteoporosis are also described.*

## **SADRŽAJ:**

UVOD .....	4
1. NASTANAK RAKA .....	2
1.1. ONKOGENI.....	3
1.2. TUMOR –SUPRESORSKI GENI .....	7
1.3. mikroRNA GENI .....	10
2. BIOAKTIVNE SASTAVNICE HRANE U PREVENCIJI I LIJEČENJU TUMORA ....	13
2.1. MED I PROPOLIS S PRIPADNIM POLIFENOLIMA .....	14
2.2. Flavanoidi.....	17
2.2.1. Kvercetin .....	19
2.2.2. Krizin i naringenin.....	20
ZAKLJUČAK .....	21

# UVOD

Rije „tumor“ u prijevodu zna i oteklina, i predstavlja izraz kojim se označava svaka nekontrolirana dioba stanica, koja nastaje uslijed poremećaja temeljnih, regulacijskih mehanizama stanice. Kao takvi, tumori (neoplazije) mogu nastati uslijed poremećaja regulacije bilo koje vrste stanica u tijelu, stoga razlikujemo više od stotinu različitih tumora. Međutim, puno bitnija stvar od njihove raznolikosti, je njihova podjela na **benigne** (dobro udne) i **maligne** (zlo udne) tumore. Benigni tumori npr. kožna bradavica, nemaju sposobnost širenja na susjedna, normalna tkiva, i ostaju lokalizirani na mjestu na kojem su nastali [1], prema tome, oni ne predstavljaju veliku opasnost i uglavnom se mogu eliminirati kiruškom intervencijom. Za razliku od njih, maligni tumori imaju sposobnost da se prošire na susjedna tkiva, procesom koji se naziva metastaziranje, koji ih čini jako ubojitim i odgovornim za veliki broj smrti širom svijeta. **Metastaza** je složen biološki proces, koji uključuje odvajanje stanica od primarnog, malignog tumora, i njihovo širenje na okolna tkiva i/ili organe preko krvožilnog ili limfatičkog sustava pritom „izbjegavaju i“ napad imunološkog sustava [2]. Bitno je naglasiti da se termin rak (kancer) koristi samo u slučaju malignih odnosno zlo udnih tumora. Nadalje, tumori se klasificiraju prema vrsti stanica iz kojih nastaju, i većina ih se svrstavaju u 3 velike grupe: karcinomi, sarkomi i leukemije ili limfomi. **Karcinomi** su zlo udne bolesti epitelnih stanica i na njih otpada 90% slučajeva raka u ljudi. **Sarkomi** koji su prilično rijetki u ljudi, predstavljaju maligne tumore vezivnog tkiva kao što su kosti, mišići, hrskavica i veziva u užem smislu. **Leukemije (limfomi)** nastaju iz hematopoetskih stanica i na njih otpada 7% slučajeva raka u ljudi.

Budući da maligni tumori odnosno rak, predstavljaju glavni uzrok smrti u svijetu, uzrokujući 8,2 miliona smrti godišnje [3], u ovom radu su opisani procesi kojima oni nastaju, te bioaktivne sastavnice hrane i njihovo uticajno djelovanje u liječenju malignih poremećaja kao i njihovom suzbijanju. Ispitujući uticaj različitih sastavnica hrane, polifenolnih spojeva poput flavanola, flavona, folnih kiselina i mnogih drugih, pokušava se objasniti kako oni djeluju na same stanice raka, te može li konzumiranje hrane, koja sadrži navedene spojeve spriječiti i preventivno djelovati na nastanak karcinoma.

# 1. NASTANAK RAKA

Jedna od glavnih karakteristika raka je klonalnost tumora, odnosno nastanak tumora iz jedne jedine stanice, koja je uslijed poremećaja nekontrolirano proliferirati. Da mnogi tumori nastaju iz jedne stanice, pokazala je analiza X kromosoma [4], gdje je primijećeno da se u tumorskim tkivima, u svim stanicama eksprimira samo jedan alel heterozigotnih gena s X kromosoma, za razliku od stanica normalnog tkiva, u kojem se eksprimira jedan ili drugi alel, ovisno o tome koji je X kromosom inaktiviran (Slika 1).

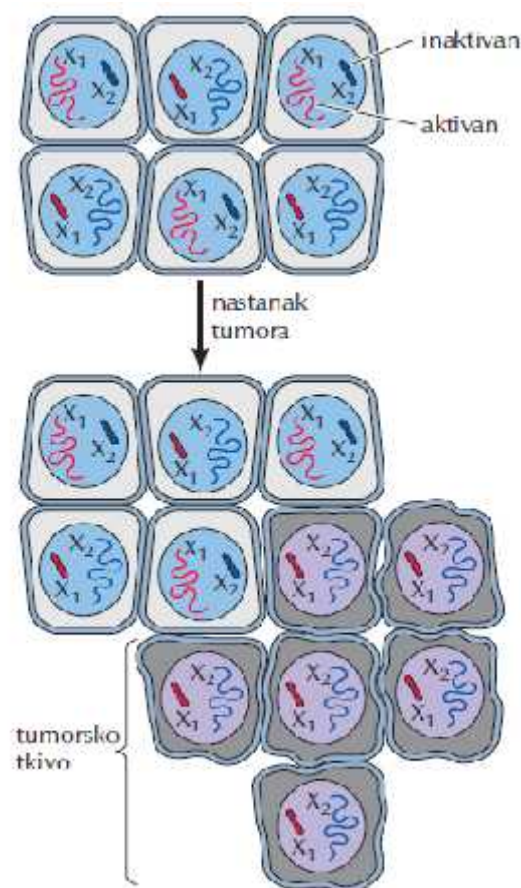
Klonalno prodijetlo tumora, međutim, ne podrazumjeva da je ishodišna stanica u početku stekla sve značajke zloćudnosti. Istraživanja su pokazala da je nastanak raka dugotrajan proces, koji se sastoji iz tri glavne faze: inicijacija, promocija i progresija[5].

**Inicijacija** je prva faza koja podrazumjeva izlaganje stanica određenoj dozi kancerogena koji

dovodi do nastanka mutacija - ireverzibilne promjene DNK. Inicijacija samostalno ne dovodi do nastanka tumora.

**Promocija** se karakterizira stimulacijom proliferacije prethodno izmijenjenih stanica. Stanice na ovoj razini još ne posjeduju sposobnost autonomnog rasta. Promjene koje nastaju u ovoj fazi su reverzibilne.

**Progresija** predstavlja period u razvoju tumora, u kojemu uslijed dodatnog nakupljanja mutacija u staničnoj populaciji, dolazi do autonomnog rasta tumora. Na taj način se kod nekih stanica povećava proliferativni potencijal, tako da te stanice imaju selektivnu prednost i s vremenom postaju dominantna populacija stanica u tumoru. Ovakva selekcija koja se naziva



Slika 1. U normalnim tkivima se uočava mozaik stanica u kojima su inaktivirani različiti X kromosomi ( $X_1$  i  $X_2$ ). Tumori nastaju iz jedne poremećene stanice, tako da je u svim tumorskim stanicama inaktiviran uvijek isti X kromosom. (preuzeto iz: Cooper – stanica; treće izdanje (2004))

klonskom selekcijom, u tumorima je konstatno prisutna, tako da oni postupno rastu sve brže i postaju sve zloudniji.

Ne postavlja se pitanje, koji dio genoma treba biti zahvaćen mutacijom da bi došlo do nastanka tumora? Promjene u onkogenima, tumor-supresorskim genima i microRNA genima glavni su uzrok nastanka tumora [6]. Uzroci mutacija u gore navedenim skupinama gena mogu biti različiti:

**okolišni imbenici** – neki kemijski spojevi, ionizirajuće zračenje, UV zračenje;

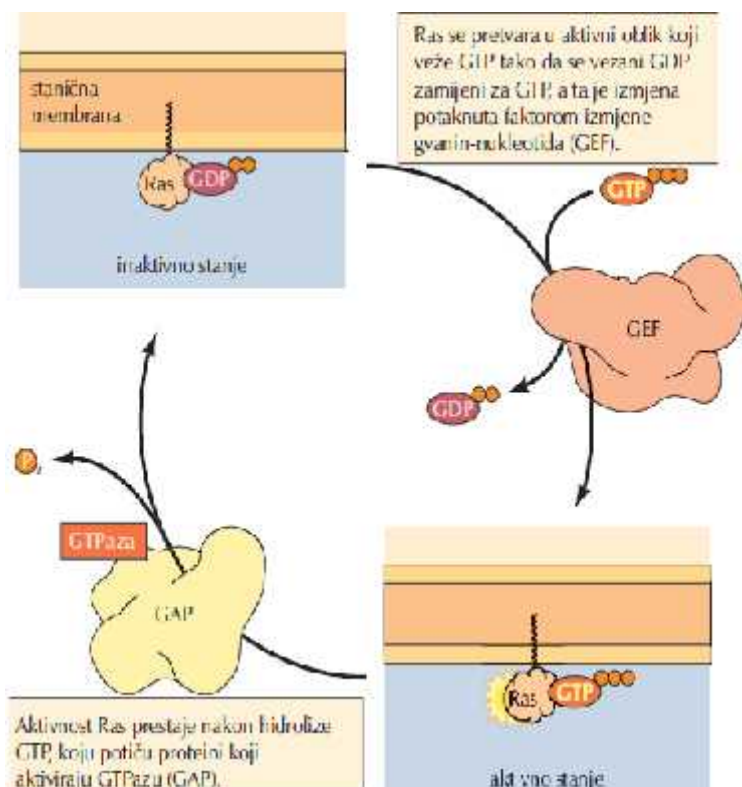
**biološki imbenici** – tumorski virusi, upalni procesi, infekcije;

**genetski imbenici** – skupina raka koje se mogu naslijediti (BRCA1 i BRCA2 geni odgovorni za nastanak raka dojke u većini slučajeva su nasljedni [7]).

## 1.1. ONKOGENI

U svim stanicama su normalno prisutni protoonkogeni koji su ekspimirani tijekom „reguliranog rasta“ kao što je embriogeneza, zacjeljivanje rana, regeneracija oštećene jetre, ili pak poticanje stanica na mitozu inducirano faktorima rasta [8]. Protoonkogeni normalno kodiraju za mnogobrojne faktore rasta, tirozin kinaze, serin/treonin kinaze, receptore za faktore rasta itd. Dakle, ovi geni i njihovi produkti su normalno prisutni u stanicama i ekspimirani su u određenim uvjetima, no ukoliko dođe do

određenih promjena u ovim genima koje mogu biti inducirane virusima, to kaskadnim mutacijama, translokacijama ili amplifikacijom gena, ovi protoonkogeni postaju „aktivirani“ i



Slika 2. Regulacija Ras proteina vezanjem GTP-a odnosno GDP-a. (Preuzeto iz: Cooper –stanica; treće izdanje (2004))

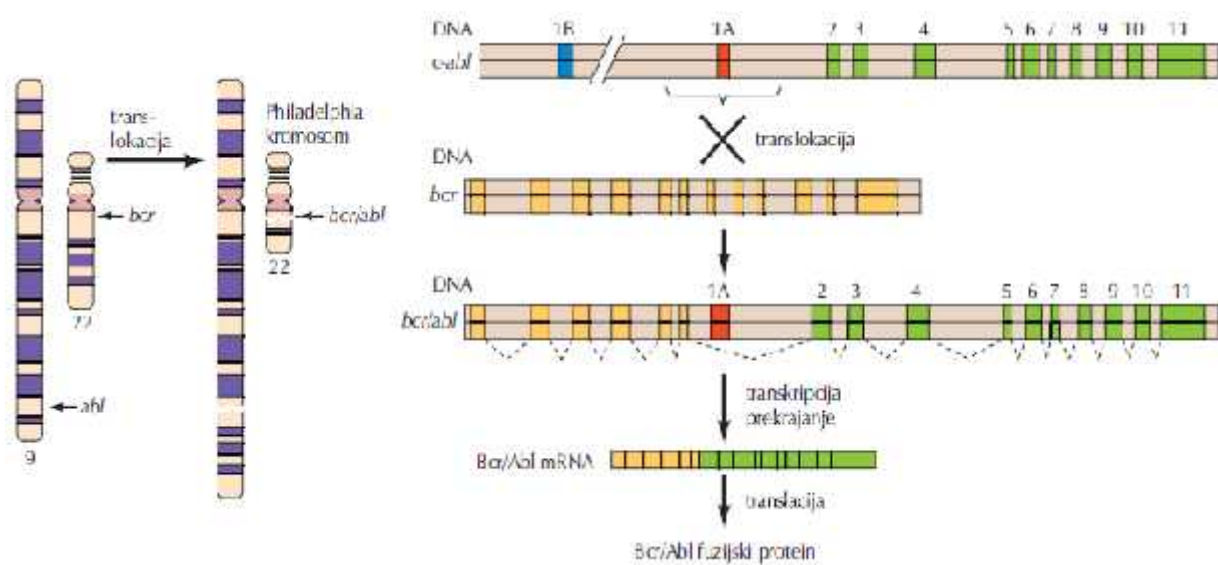
tada se nazivaju **onkogeni**. Stoga se onkogeni mogu definirati kao prekomjerno eksprimirani ili mutirani protoonkogeni, koji dovode do nekontrolirane proliferacije stanica i nastanka raka.

Jedan od onkogeni koji se povezuje s nastankom preko 20% svih malignih tumora u ljudi, uključujući i 50% slučajeva raka debelog crijeva i 25% slučajeva raka pluća, je **ras** onkogen. Porodica *ras* protoonkogeni kodira proteine molekularne mase 21 000 Da, koji vežu gvaninske nukleotide i sudjeluju u procesu prijenosa mitogenih signala od različitih receptora za faktore rasta. Aktivnost Ras proteina ovisi o vezanju GTP-a, odnosno GDP-a, tako da se nakon primanja signala od receptora u Ras proteinu potpuno zamjena GDP-a s GTP-om i to faktorom izmjene gvanin –nukleotida (GEF), čime on prelazi u aktivan oblik. Nakon prenosa dolazi do hidrolize GTP-a proteinima koji aktiviraju GTP-azu (GAP), čime se Ras protein ponovno vraća u svoje neaktivno stanje (Slika 2). Uočeno je da je Ras protein konstantno aktivan u stanicama raka, također je uočeno da *ras* onkogen nije prisutan u normalnim stanicama, što upućuje na zaključak da njegov potencijal da inducira nastanak raka ne dolazi od činjenice da je došlo do prekomjerne ekspresije pripadnog protoonkogeni, već da je došlo do mutacije u protoonkogenu čime je narušena normalna funkcija proteina kodiranog ovim genom. Uistinu, sekvenciranjem različitih stanica raka uočene su točke mutacije u ovom genu na kodonima 12, 13 i 61 koje su odgovorne za nastanak tumora [9]. Biokemijske analize stanica divljeg tipa, i onih koje nose mutacije u genu *ras* na kodonima 12, 13 i 61, su pokazale da je glavna razlika između u njih sposobnost GAP da inducira hidrolizu GTP-a u proteinu Ras vraćajući ga u neaktivnom obliku [10]. Stoga takav protein u stanicama raka je konstantno aktivan, i kontinuirano šalje mitogene signale, čime se podstiče nekontrolirana proliferacija a samim tim i nastanak raka.

Da točke mutacije nisu jedini način „aktivacije“ protoonkogeni pokazuje uloga *c-myc* gena u Burkittovom limfomu i mišijem plazmocitomu, koji nastaju uslijed translokacije kromosoma. U obje vrste tumora se redovito nalaze kromosomske translokacije koje zahvaćaju područje gena za imunoglobuline. U gotovo svim Burkittovim limfomima se nalazi translokacija kratkog segmenta 8. kromosoma na jedan od lokusa imunoglobulinskih gena na 2. kromosomu (laki lanac), na 14. kromosomu (teški lanac) i na 22. kromosomu (laki lanac). Analiza je pokazala da se u Burkittovim limfomima na mjestu lom na 8. kromosomu nalazi protoonkogen *c-myc* koji se translokacijom umetne u imunoglobulinske lokuse [11]. Posljedica toga je prekomjerna ekspresija *c-myc* gena koji u normalnim uvjetima, stimuliran faktorima rasta kodira transkripcijske faktore, a uzrok te prekomjerne ekspresije je utjecaj

pojavljaju se za imunoglobuline koji počinju djelovati na *c-myc* nakon njegove translokacije na lokuse za imunoglobuline.

Translokacijom također može doći do poremećaja u kodirajućem dijelu gena i time nastaju abnormalni produkti koji mogu inducirati nastanak tumora, primjer za to jest translokacija *abl* protoonkogene s 9. na 22. kromosom u kroničnoj mijeloidnoj leukemiji [12]. Ova translokacija dovodi do fuzije *abl* s genom *bcr* s 22. kromosoma (Slika 3). Posljedica toga je stvaranje fuzijskog Bcr/Abl proteina u kojemu je normalni amino-kraj Abl protoonkogenog proteina zamijenjen aminokiselinskim slijedom iz Bcr proteina. To dovodi do poremećaja Abl protein-tirozin-kinaze i dolazi do transformacije stanica.

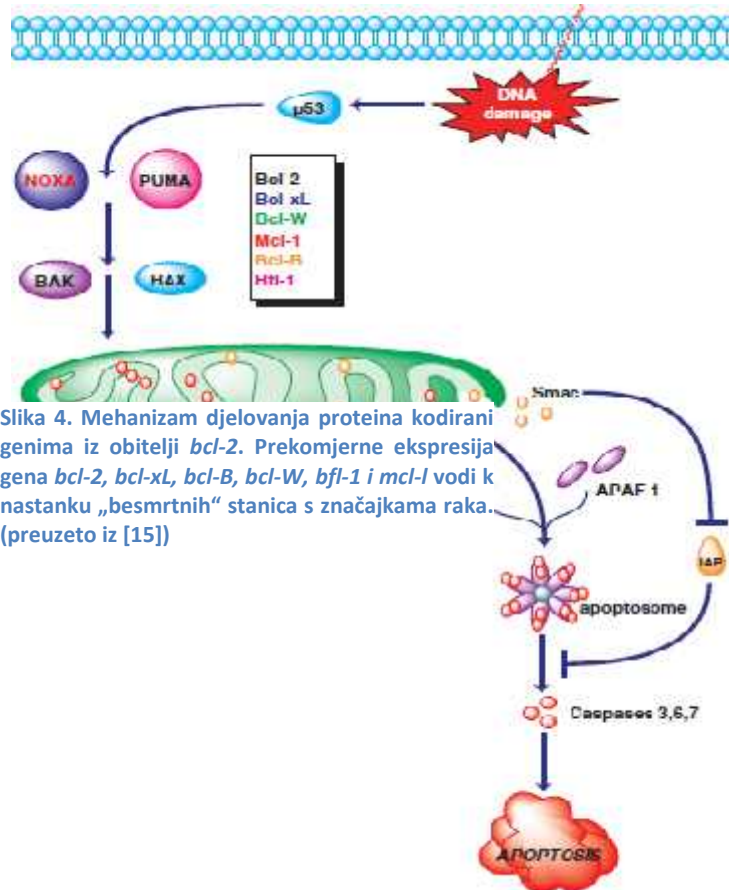


Slika 3. U kroničnoj mijeloidnoj leukemiji Philadelphia kromosom nastaje translokacijom *abl* protoonkogene s 9. na 22. kromosom. Time dolazi do spajanja *abl* protoonkogene, koji ima dva alternativna prva egzona (1A i 1B) i *bcr* gena s 22. kromosomom. Zbog translokacije dolazi do delecije egzona 1B. Transkripcija hibridnog gena započinje na promotoru *bcr* i nastavlja se cijelom tokom *abl*. Prekrajanjem nastaje hibridna Bcr/Abl mRNA iz koje je izrezan egzon 1A *abl* gena, a slijed nukleotida iz *bcr* spojen je s 2. egzonom *abl* gena. Translacijom iz Bcr/Abl mRNA nastaje rekombinantni Bcr/Abl fuzijski protein. (preuzeto iz: Lodish –molecular cell biology; 5th edition (2000))

Amplifikacija gena još je jedan način koji može inducirati nastanak karcinoma. Naime ukoliko se u stanici nalazi veliki broj kopija jednog istog gena, onda će količina produkta tog gena u stanici biti puno veća. U slučaju da je gen koji je amplificiran odgovoran za regulaciju i rast stanica, onda u takvim okolnostima postoji veliki rizik od nastanka raka. Jedan od primjera za karcinogenezu uzrokovanu amplifikacijom je amplifikacija gena *n-myc* koja uzrokuje neuroblastome [12]. Također transgeni miševi kojima je genetičkim modifikacijama povećana ekspresija *n-myc* gena razvijaju neuroblastome [13].



Stvaranje besmrtnih stanica mehanizmom sprijeavanja apoptoze, još je jedan na in indukcije tumora. Primjer za to je obitelj gena *bcl-2* (engl. B-cell lymphoma/leukemia-2) koja uključuje gene koji potiču apoptozu i gene koji inhibiraju apoptozu u stresnim uvjetima. U ljudi je otkriveno 6 gena iz obitelji *bcl-2* koji inhibiraju apoptozu (*bcl-2*, *bcl-xL*, *bcl-B*, *bcl-W*, *bfl-1*, i *mcl-1*). Proteini koji kodiraju ovi geni imaju hidrofobni “džep” koji može vezati druge proteine koji potiču apoptozu a kodirani su genima koji također pripadaju



Slika 4. Mehanizam djelovanja proteina kodirani genima iz obitelji *bcl-2*. Prekomjerne ekspresija gena *bcl-2*, *bcl-xL*, *bcl-B*, *bcl-W*, *bfl-1* i *mcl-1* vodi k nastanku „besmrtnih“ stanica s značajkama raka. (preuzeto iz [15])

obitelji *bcl-2* gena (*bcl-2*, *bcl-xL*, *bcl-B*, *bcl-W*, *bfl-1* i *mcl-1*). Stoga ukoliko su ovi proteini (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-B, Bcl-W, Bfl-1 i Mcl-1) koji inhibiraju apoptozu u suvišku, onda će oni vezati protein koji potiču apoptozu a krajnji rezultat toga je izostanak apoptoze. Ukoliko su pak proteini koji potiču apoptozu u suvišku onda se oni usmjeravaju u vanjsku membranu mitohondrija gdje potiču oslobađanje efektora apoptoze kao što su SMAC ili citokrom c. Oslobođeni citokrom c veže APAF-1 i pro-kaspazu 9 formirajući apoptosom. Tako nastaje “zrela” kaspaza 9 čime započinje proteolitička kaskada i dolazi do stanja ne smrti odnosno apoptoze [14] (Slika 4). Iz ovoga se može zaključiti da ukoliko dođe do promjene koncentracija u ovim proteinima, dolazi do narušavanja homeostaze što može voditi ka nastanku različitih poremećaja. Jedan od takvih poremećaja je translokacija dijela 14. kromosoma na kojem se nalaze geni obitelji *bcl-2*, na 18. kromosom na kojem se nalazi lokus za imunoglobuline. Time se pojačava ekspresija *bcl-2* gena tako da su oni u suvišku, vežu proteine Bad, Bak i Bax i spriječavaju apoptozu, stvaraju i na taj način folikularni limfom. Placzek i sur. potvrdili su znatno povećanu ekspresiju mRNA kodiranu *bcl-2* genima [15].

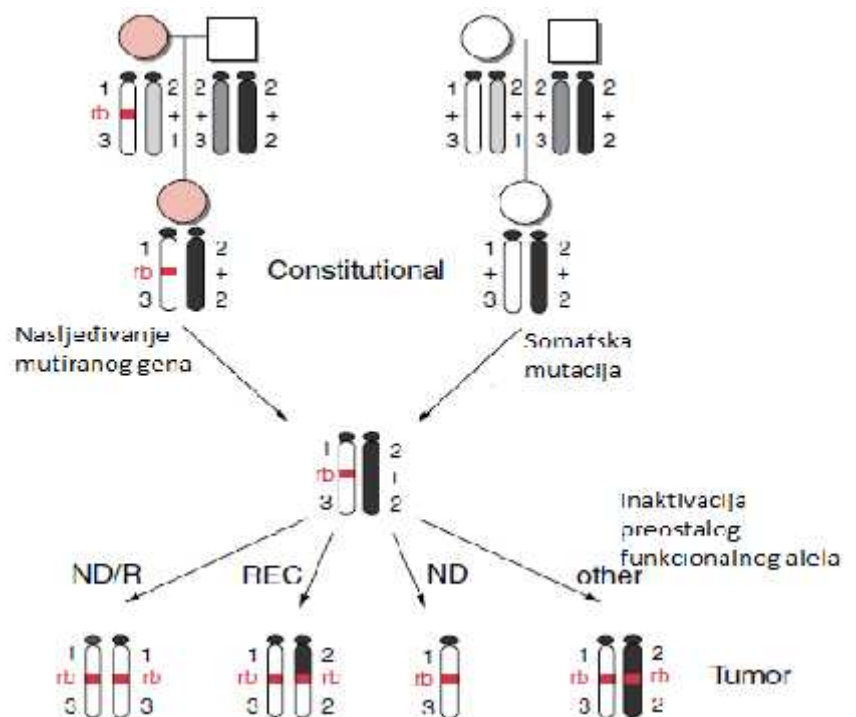
Može se reći i da translokacije, točke mutacije i amplifikacije, uzrokovane velikim brojem kromosomskih promjena, predstavljaju glavne mehanizme „aktivacije“ protoonkogenih u onkogene

koji uzrokuju nekontroliranu proliferaciju, izostanak apoptoze ili druge procese kojima nastaju tumori.

## 1.2. TUMOR –SUPRESORSKI GENI

Aktivacija stani nih onkogeni samo je jedan od na ina kojim nastaju tumori. Pored aktivacije onkogeni, tumor se može inducirati i inaktivacijom jedne druge skupine stani nih gena, koji imaju potpuno suprotnu ulogu od onkogeni i nazivaju se tumor –supresorski geni. Dok onkogeni dovode do poreme aja u stani noj proliferaciji, tumor –supresorski geni rade suprotno, oni inhibiraju stani nu proliferaciju i nastanak tumora. Analizom genotipa tumorskih stanica pokazalo se da u mnogim vrstama tumora uop e ne postoji produkti kodirani tumor–supresorskim genima, bilo zbog delecije [19], epigeneti kog utišavanja putem hipermetilacije [20] ili nekog drugog mehanizma koji sprije ava njihovu ekspresiju. Pokusima hibridizacije stanica došlo se do prvih naznaka o djelovanju tumor–supresorskih gena. Naime fuzijom normalnih i

tumorskih stanica nastaju hibridne stanice koje u ve ini slu ajeva nemogu stvarati tumore u životinjama [21]. Iz toga se zaklju ilo da geni normalne stanice suprimiraju nastanak tumora, i ti geni su kasnijim analizama otkriveni kao tumor–supresorski geni. Istraživanja ra ena na retinoblastomima dovela su do otkri a prvog takvog gena. Ukoliko se retinoblastoma rano dijagnostificira, bolesnici dovoljno dugo prežive da osnuju svoju obitelj, što je izuzetno bitno, pogotovu zato što 50% njihove djece tako er ima retinoblastom što ukazuje da je za sklonost nastanku tumora odgovoran



jedan gen koji se nasljeđuje autosomno dominantno u skladu sa Mendelovim pravilima, i nazvan je *rb* genom.

Iako se sklonost nastanku retinoblastoma nasljeđuje kao autosomno dominantno svojstvo, *rb* gen nije sam po sebi dovoljan za malignu transformaciju. Dakle sve somatske stanice su naslijedile *rb* gen (od roditelja koji već ima retinoblastoma) ali je samo mali broj njih postati tumorske. Stoga za nastanak retinoblastoma uz nasljednu sklonost

**Slika 5. Generalni mehanizam gubitka heterozigotnosti i nastanak retinoblastoma.** Prva mutacija se može naslijediti ili može nastati somatskom mutacijom. No za nastanak retinoblastoma potrebna je druga mutacija koje će inaktivirati preostali funkcionalni alel. To se postiže nerazdvajanjem i duplikacijom kromosoma koji nosi mutirani gen (ND/R), mitotskom rekombinacijom (REC), nerazdvajanje (ND) ili nekim drugim mehanizmom. (preuzeto i prilagođeno iz Holland and Feri – cancer medicine; 8th edition (2009))

nužna je dodatna mutacija koja će rezultirati u gubitaku preostalog funkcionalnog alela odnosno gubitku heterozigotnosti (Slika 5). Često uočena delecija kod retinoblastoma je 13q14 što potvrđuje da tumori nastaju inaktivacijom (a ne aktivacijom kao onkogeni) tumor-supresorskih gena, što dalje potvrđuje mehanizam djelovanja istih. Što gen *rb* čini tako esencijalnim da njegovim gubitkom dolazi do pojave tumora? Odgovor leži u funkciji proteina pRb kodiranim *rb* genom. Naime pRb je uključen u regulaciju staničnog ciklusa a njegova aktivnost ovisi o stupnju njegove fosforilacije. Tijekom G1 faze on je hipofosforiliran i vezan za dimer E2F/DP sprječavajući i transkripciju enzima bitnih za S fazu staničnog ciklusa. Progresijom staničnog ciklusa dolazi do fosforilacije pRb enzimima CDK4 i CYCD1 što uzrokuje njegovu disocijaciju s E2F/DP dimera i dolazi do ekspresije enzima S faze (Slika 6). U tumorskim stanicama ne postoji pRb stoga dolazi do konstitutivne ekspresije enzima S faze što vodi k nekontroliranoj proliferaciji [22].

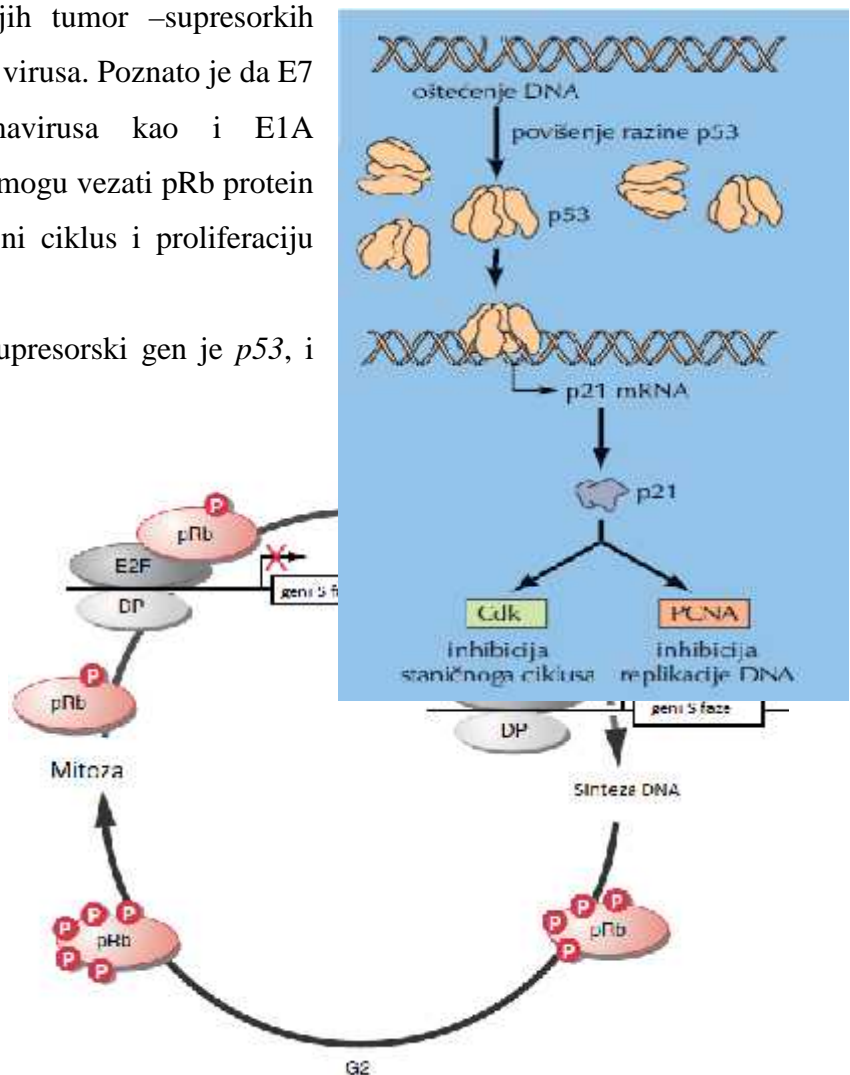
**Slika 6. Fosforilacijom regulirana aktivnost proteina pRb.** U prvoj G1 fazi protein pRb je hipofosforiliran i vezan za dimer E2F/DP, koje se nalaze na promotoru gena za Sfazu, i sprječava transkripciju. Progresijom staničnog ciklusa enzimi CDK4 i CYCD1, koji su odgovori za prijelaz R točke u G1 fazi, fosforiliraju pRb. Fosforilacijom se smanjuje afinitet pRb-a za dimer E2F/DP i on disocira. Nakon njegove disocijacije moguća je transkripcija gena S faze. Stupanj fosforilacije je najveći u G2 fazi. Nakon završenog ciklusa pRb se ponovno vraća u hipofosforilirano stanje. (preuzeto i prilagođeno iz: Holland and Feri – cancer medicine; 8th edition (2009))

Kao jedan od najvažnijih tumor –supresorskih gena *rb* je esto meta onkogenih virusa. Poznato je da E7 onkoprotein ljudskih papillomavirusa kao i E1A onkoprotein adenovirusa tipa 5, mogu vezati pRb protein i na taj na in poremetiti stani ni ciklus i proliferaciju [23,24].

Drugi otkriveni tumor–supresorski gen je *p53*, i esto je inaktivan u nizu ljudskih tumora poput leukemije, sarkoma, tumora mozga i razli itih karcinoma. Sveukupno mutacije u *p53* pridonose nastanku 50% svih slu ajeva raka što ga ini naj eš om metom genskih promjena u ljudskim malignomima. Produkt gena *p53* je protein molekularne mase 53 kD (po emu je gen i dobio naziv) uklju en je u

regulaciju stani nog ciklusa i apoptoze. Regulacija stani nog ciklusa proteinom *p53* usko je povezana sa gore spomenutim pRb-om. Naime, kada do e do ošte enja DNA inducira se *p53* koji aktivira transkripciju *p21* (Slika 7) inhibitora Cdk proteina. Inhibicijom Cdk proteina onemogu ava se fosfoilacija pRb, nefosforilirani pRb je vezan za dimer E2F/DP i onemogu ena je transkrpcija gena S faze (Slika 6). Na taj na in stanica ne može pro i R (restrikcijsku) to ku i ostaje “zato ena” u G1 fazi što joj daje vremena da popravi ošte enu DNA.

Ukoliko u stanici nije prisutan *p53* izostati e zaustavljanje stani nog ciklusa uslijed ošte enja DNA ime dolazi do pove anja ferekvencije mutacija i nestabilnosti genoma što predstavlja prvi korak u promociji tumora. Druga funkcija proteina *p53* je indukcija apoptoze uslijed ošte enja DNA, a njegov u inak posredovan je aktivacijom transkripcije gena iz familije



Slika 7. regulacija ekspresije gena *p21*. Lomom DNA inducirani *p53* potiče transkripciju *p21* koji dalje djeluje na Cdk kinaze inhibirajući stanični ciklus i PCNA inhibirajući replikaciju DNA. (preuzeto iz: Cooper – stanica; treće izdanje (2004))

Bcl-2 (vidi poglavlje “onkogeni”) koji inducira stani nu smrt.

Danas se zna za veliki broj tumor–supresorskih gena (Tablica 1), ali za sve njih je karakteristi no da njihovom inaktivacijom nastaju tumori, prvenstveno zbog gubitka negativne regulacije.

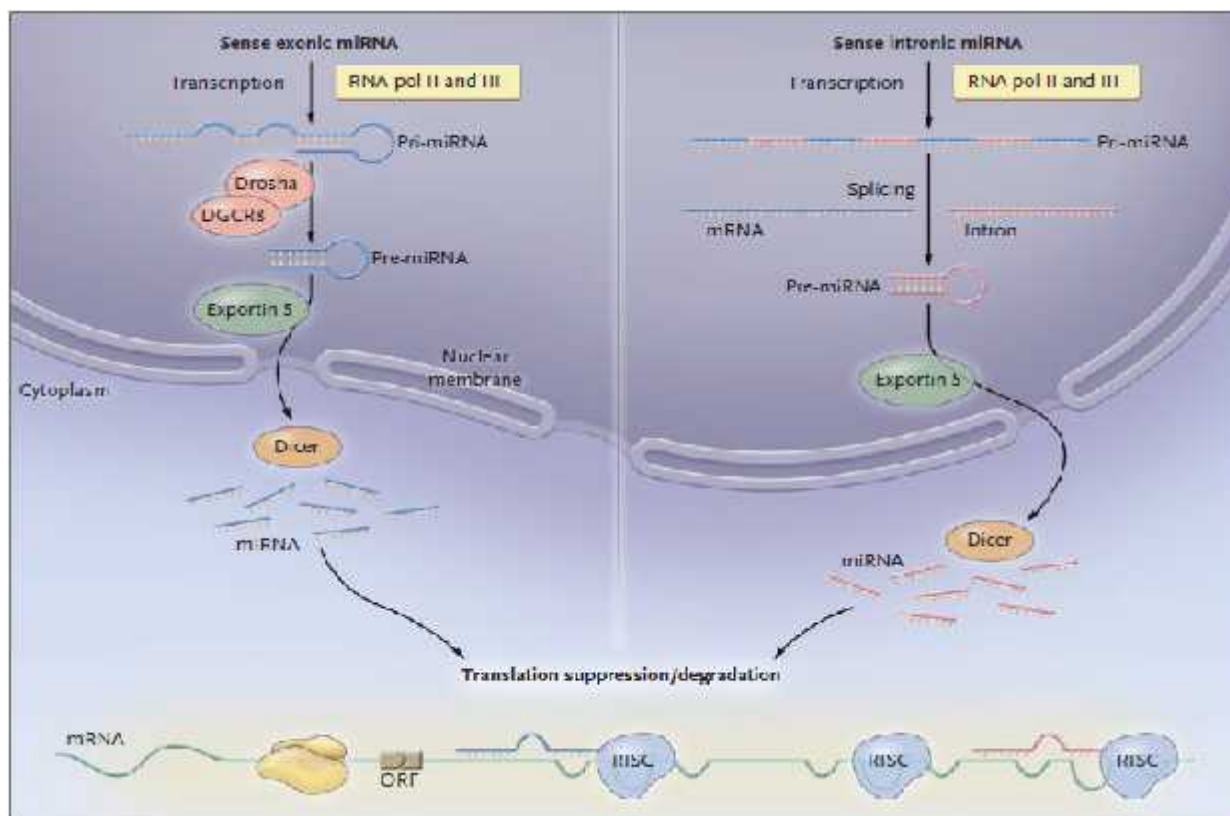
**Tabela 1 Tumor-supresorski geni i vrste raka koje nastaju njihovom inaktivacijom.**(preuzeto iz Cooper –stanica 3. Izdanje)

Gen	Vrste raka
<i>APC</i>	karcinom debelog i završnoga crijeva
<i>BRCA1</i>	karcinom dojke i jajnika
<i>BRCA2</i>	karcinom dojke
<i>INK4</i>	melanom, karcinom pluća, tumori mozga, leukemije, limfomi
<i>NF1</i>	neurofibrosarkom
<i>NF2</i>	meningeom
<i>p53</i>	tumori mozga; karcinomi dojke, debelog i završnoga crijeva, jednjaka, jetre i pluća; sarkomi; leukemije i limfomi
<i>PTC</i>	bazaliom
<i>PTEN</i>	tumori mozga; melanom; karcinom prostate; trupa maternice, bubrega i pluća
<i>Rb</i>	retinoblastom; sarkomi; karcinom mjehura, dojke i pluća
<i>Smad2</i>	karcinom debelog i završnoga crijeva
<i>Smad4</i>	karcinom debelog i završnoga crijeva i gušterače
<i>TBR11</i>	karcinom debelog i završnoga crijeva i želuca
<i>VHL</i>	karcinom bubrega
<i>WT1</i>	Wilmsov tumor

### 1.3. MIKRORNA GENI

Za razliku od onkogeni i tumor-supresorskih gena iji je kona ni product protein, microRNA geni ne kodiraju za protein. Naime, kona ni produkti microRNA gena su molekule RNA koje imaju 21-23 nukleotida, i njihova je funkcija kontrola ekspresije drugih gena. Takva microRNA je komplementarna s mRNA odre enog gena, iju ekspresiju regulira, i njihovom hibridizacijom post-transkripcijski se regulira ekspresija toga gena. U ovisnosti o stupnju komplementarnosti s mRNA, microRNA može blokirati translaciju (nepotpuna homologija) ili pak razgraditi mRNA (potpuna homologija) (Slika 8). U stanicama raka se pojavljuju “utišani” microRNA geni ili prekomjerno eksprimirani microRNA geni. Ho e li microRNA geni biti utišani ili prekomjerno eksprimirani ovisi o vrsti ciljnih gena na koje djeluju. Ukoliko microRNA djeluje na tumor–supresorske gene onda e takvi geni u stanicama raka biti prekomjerno eksprimirani, prije avaju i translaciju tumor–supresorskih proteina, što vodi k nastanku raka.





Slika 8. microRNA (miRNA) se prepisuje preferentno RNA polimerazom II, a ponekad i sa RNA polimerazom III. Primarni transkript (pri-microRNA) se procesira jezrenim enzimima Drosha i DGCR8, nakon čega nastaje manja (70-100 nukleotida) pre-microRNA. Eksportin 5 zatim prebacuje pre-microRNA iz jezgre u citoplazmu. Djelovanjem citoplazmatskog enzima Dicer nastaje zrela microRNA. Ova zrela microRNA se veže na 3' netranslatiranu regiju mRNA i u ovisnosti o stupnju komplementarnosti može razgraditi mRNA ili samo spriječiti njenu translaciju. (preuzeto iz [6] )

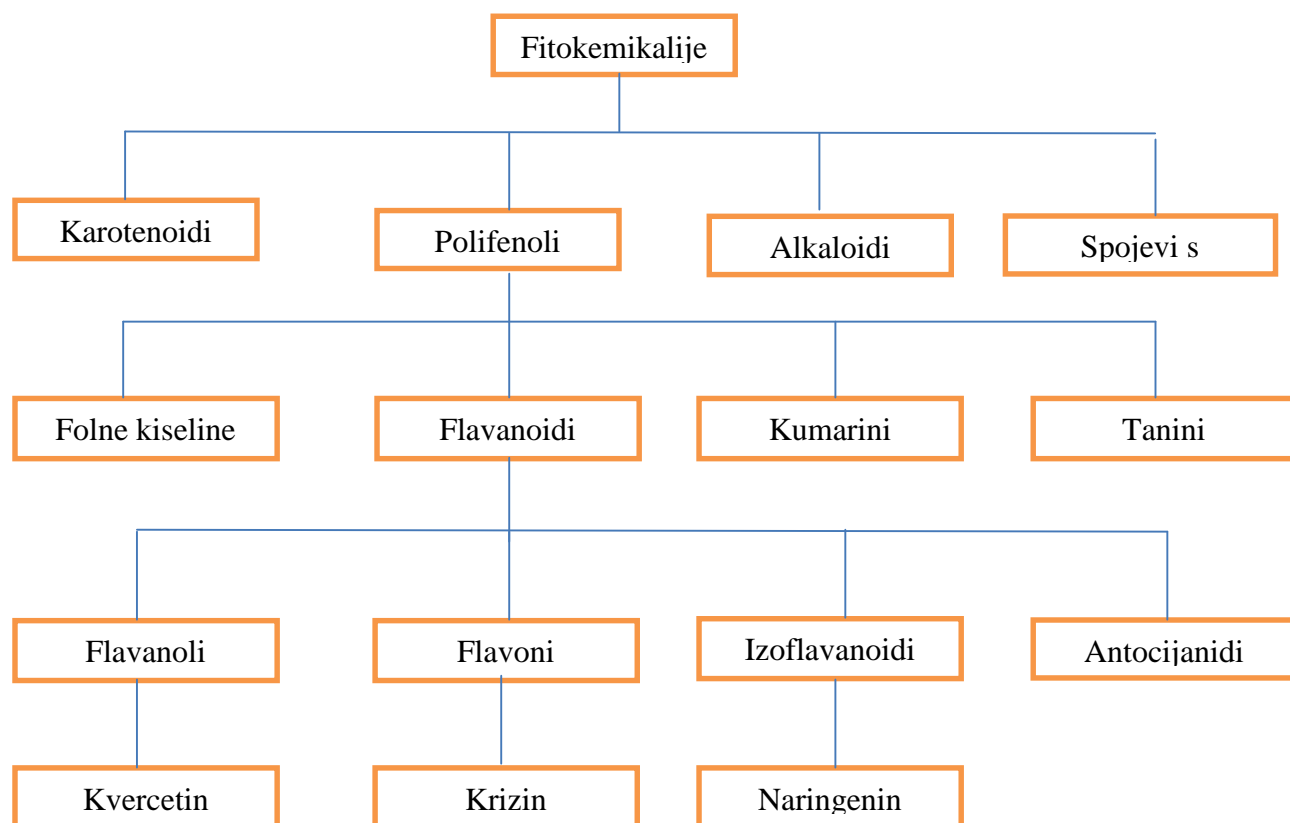
Ukoliko pak microRNA djeluje na onkogene, onda e u stanicama raka ovi geni biti utišani, ime se gubi kontrola nad onkogenima koji zatim prekomjernom ekspresijom induciraju nastanak raka. Postavlja se pitanje, što dovodi do utišavanja ili prekomjerne ekspresije microRNA gena? Prekomjerna ekspresija microRNA gena može biti posljedica gubitaka regulacije transkripcijskih faktora, amplifikacije ili pak demetilacije CpG otoka u području promotora. Na primjer, u stanicama limfoblasti ne ili mijeloblasti ne leukemije, koje sadrže fuzijske ALL1 (MLL) proteine, uočena je 11q23 translokacija kromosoma koja zahvaća Drosha nukleazni kompleks, povećavaju i procesiranje specifične pri-microRNA [16]. Također *miR155* je prekomjerno eksprimiran u B-limfomima [17] i agresivnim oblicima raka dojke, pluća i debelog crijeva.

S druge strane utišavanje microRNA gena može biti posljedica delecija, epigenetičkog utišavanja ili pak gubitak transkripcijskih faktora. Na primjer u stanicama raka pluća, utišani su microRNA geni iz obitelji LET7. Produkti ovih gena djeluju na RAS proteine (vidi poglavlje „onkogeni“) reguliraju i njihovu ekspresiju. Utišavanjem tih gena *ras* se prekomjerno eksprimira induciraju i karcinom. Utišavanje gena *Mir15a* i *miR-16-1* dovodi do prekomjerne ekspresije *bcl2* koji sprječava apoptozu i dovodi do razvoja karcinoma [18]

Budu i da microRNA geni reguliraju ekspresiju gena posttranskripcijski, gubitkom njihove funkcije ne dolazi do brze indukcije tumora (npr. aktivacijom onkogeni indukcija je puno brža). Stoga se profiliranjem microRNA gena može dijagnosticirati tumor koji je još u ranoj fazi svoga nastanka.

## 2. BIOAKTIVNE SASTAVNICE HRANE U PREVENCIJI I LIJEČENJU TUMORA

Maligna oboljenja su odgovorna za smrt gotovo petine svjetske populacije, i nažalost, za većinu njih čak i kada se dijagnosticiraju relativno rano, ne postoji odgovarajuća i na liječenje koji bi ih izliječio. Veliki broj metoda koje se danas koriste u liječenju malignih oboljenja, dovode do pojave širokog spektra nuspojava, čime se dodatno pogoršava već loše stanje organizma. Jedan od estih pristupa u liječenju je korištenje različitih kemoterapeutika. No, uoeno je da djelovanje kemoterapeutika (uključujući i one prirodne kao što su epirubicin, taksol i dr.) ima za posljedicu smanjeni broj hematopoetskih stanica u koštanoj srži [25]. Ukoliko se pak pri liječenju koristi radioterapija, postoji rizik od pojave hematopoetskog sindroma. Tako er radioterapija može izazvati mukozitis u 20-40% pacijenata, a ako se koristi u kombinaciji sa radijacijom broj se povećava na 80% [26].



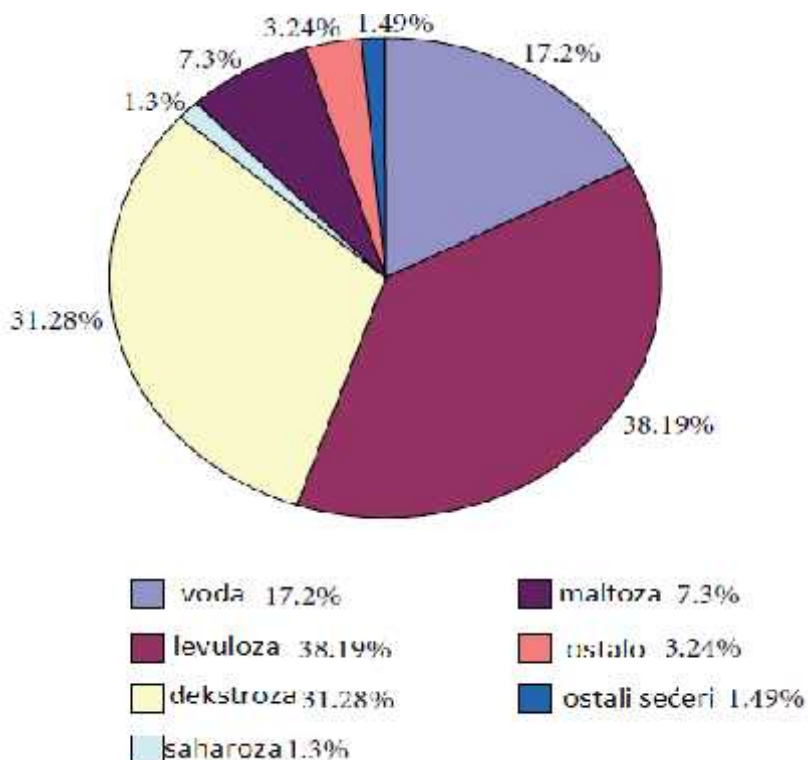
Slika 9. Opća podjela fitokemikalija s detaljnijom podjelom onih spojeva koji će biti obrađeni dalje u tekstu. (prema podacima iz [28] )



Jako mala uspješnost ovih metoda, kao i veliki broj nuspojava, ponukala je znanstvenike da istražuju u inak prirodnih tvari na tumore. Brojnim istraživanjima potvrđeno je da fitokemikalije (različiti metaboliti biljaka) inhibiraju nastanak tumora i metastaze kao i da induciraju apoptozu tumorskih stanica, što daje veliku nadu za poboljšanje liječenja malignih oboljenja [27]. Druga jako bitna stvar za fitokemikalije je ta da se mogu kombinirati sa standardnim kemoterapijskim spojevima. Tako na primjer različiti polifenoli prisutni u medu i propolisu poboljšavaju djelovanje kemoterapeutika na tumorske stanice pritom „štite i“ normalne stanice [39]. Fitokemikalije predstavljaju izuzetno veliku skupinu kemijskih spojeva. Njihova opća podjela je prikazana na Slici 9.

## 2.1. MED I PROPOLIS S PRIPADNIM POLIFENOLIMA

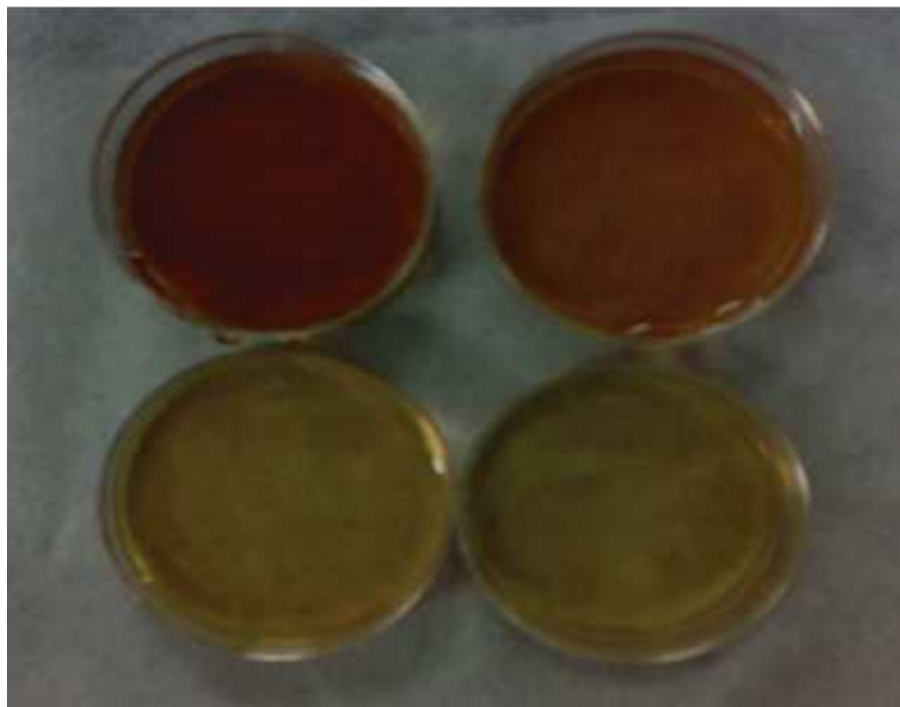
Med je prirodni produkt pčela radilica koje ga proizvode od nektara skupljenog s velikog broja biljnih cvjetova. Za proizvodnju oko 0,5 kg meda pčela mora skupiti nektar s oko 2 milijuna različitih cvjetova zbog čega je med jako heterogenog sastava i sadrži široki spektar kemijskih spojeva. Glavni sastojci meda su šećeri (79.6%) i voda (17.2%). Od šećera su najzastupljeniji levuloza (38.19%) i dekstroza (31.28%), dok su u manjem postotku prisutni maltoza (7.3%) i saharoza (1.3%) (Slika 10).



Slika 10. Sastav meda s izraženim postotcima pojedinih tvari. (preuzeto iz [48])

Ostale tvari su prisutne u znatno manjim količinama: kiseline (0.57%), proteini (0.266%), dušik (0.043%), aminokiseline (0.1%), minerali (0.17%) i različite druge tvari kao što su vitamini, polifenoli, šećerni alkoholi, pigmenti, na koje otpada 2,1 % ukupnog sastava meda

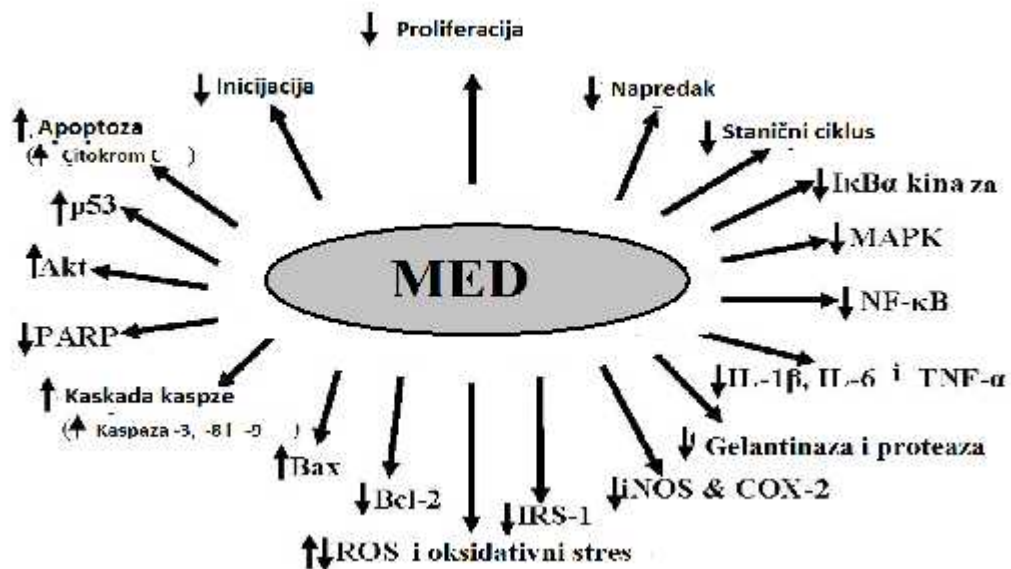
[46,47]. O sastavu gore navedneih tvari ovisi okus kao i boja meda koja može biti od blijedo žute do tamno žute (Slika 11). Općenito, što je med tamniji to je bolja kvaliteta i okus.



Slika 11. Različite boje meda od tamno žutog do blijedo žutog. Što je boja tamnija to je med kvalitetniji i boljeg je okusa. (preuzeto iz [48]).

S druge strane propolis je smolasta smjesa koju pčele prikupljaju sa pupoljaka stabala, biljnih sokova ili drugih biljnih izvora. Koristi se kao sredstvo za brtvljenje neželjenih otvora na košnici. Unosom u košnicu upotrebljavaju ga za izgradnju ulaza, zatvaranje pukotina i rupa i skladištenje odnosno "sterilizaciju" ćelija saća. Smatra se da propolis je dobio ime od grčke riječi *propoliso* koja bi na grčkom zamazivati-zaglaviti. Propolis sadrži visoke koncentracije različitih fitokemikalija poput mješavine različitih polifenola, flavanoida, fenolnih kiselina i njihovih estera i fenolnih aldehida i ketona [29].

Zbog izrazito heterogenog sastava propolis i med su postali predmet brojnih istraživanja koje su pokazale da med i propolis imaju anti-upalnu i antitumorsku aktivnost, poticanje apoptoze tumorskih stanica kao i sprječavanje metastaza (Slika 12)[30,49,50]. Daljnja istraživanja su pokazala da su ova svojstva meda i propolisa prvenstveno posljedica prisutnosti polifenola [51-53]. Polifenoli su široko rasporstranjena skupina kemijskih spojeva. Do danas je opisano oko 8000 različitih kemijskih struktura polifenola. Flavanioidi predstavljaju najveću u skupinu polifenola s oko 5000 različitih spojeva i ova skupina će biti detaljnije opisana dalje u tekstu.



Slika 12. Mehanizmi djelovanja meda. Slika prikazuje antitumorski, antimetastatski u inak meda kao i poticanje apoptoze, i sprječavanje inicijacije tumora. (preuzeto iz [54])

Artepilin C (sastojak propolisa) pokazuje citostatičnu i citotoksičnu aktivnost na različitim stanicama tumora i to aktiviranjem imunološkog sustava [31]. Kasnija istraživanja su pokazala da je povećanje broja makrofaga i njihove fagocitne aktivnosti, glavni mehanizam antitumorskog djelovanja propolisa [32].

Vodena otopina propolisa (engl. Water-soluble derivative of propolis, WSDP), kavena kiselina (engl. caffeic acid) i ester kavene kiseline (engl. Caffeic acid phenethyl ester, CAPE) su bili injicirani peritonealno u miševе prije i nakon inokulacije tumorskih stanica i pokazali su izuzetnu visoku moć u inhibiciji rasta tumora kao i prevenciji od nastanka istog, pritom pokazuju i izravan u inak aktivacijom makrofaga, i neizravan u inak koji je vjerojatno posljedica tvari poput dušikovog oksida (NO) stvoren od strane makrofaga [27].

Da bi se istražilo kako pojedina komponenta propolisa djeluje (direktno ili indirektno), WSDP, CAPE i CA su bili injicirani subkutano i odmah nakon toga su bile inokulirane tumorske stanice na istom mjestu gdje su prethodno bile injektirane pojedine komponente. Prisutnost CAPE i CA u tkivu u kojem su inokulirane tumorske stanice, značajno je inhibirala rast tumora i produljila je životni vijek tretiranih životinja za 29% - 51%. S druge strane WSDP je bio manje učinkovit [33]. Rezultati upućuju da se mehanizam djelovanja CAPE i CA razlikuje od mehanizma kojim WSDP djeluje na tumore. Naime CA i CAPE imaju sposobnost inhibicije sinteze DNA u stanicama tumora kao i sposobnost indukcije apoptoze tumorskih stanica [34]. činjenica da induciraju apoptozu tumorskih

stanica ukazuje da se CAPE i CA mogu koristiti kao antitumorski kemoterapeutici u kliničkoj praksi.

Izravni i indirektni polifenolni sastavnici propolisa aktivacijom makrofaga predstavljaju jedno od njihovih glavnih obilježja. Nakon aktivacije dolazi do njihovog širenja po organizmu, i povećava se sposobnost vezanja i fagocitoze. Obrada sa polifenolima pokazuje povećanu sposobnost fagocitoze i vezanje makrofaga u odnosu na neobradene stanice. Aktivacijom makrofaga također se podstiče stvaranje različitih citokina kao što su IL-1, IL-6, IL-8 [35]. Neki od ovih citokina pokazuju direktnu citotoksičnost u odnosu na tumorske stanice, dok drugi djeluju na NK stanice i citotoksične limfocite T aktiviraju i njihovu funkciju. Nadalje citokini mogu potaknuti proizvodnju antitijela, C-reaktivne proteine i komplemente C3, koji mogu djelovati kao opsonini na tumorske stanice [36]. Jedan od najbolje proučanih faktora proizvedenih od strane aktiviranog makrofaga je vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), faktor nekroze tumora, i dušikov oksid [37,38].

Svim gore opisanim mehanizmima propolis sa pripadnim polifenolima djeluje izravno na tumor pokazujući i antitumorsku aktivnost. No, još jedna jako bitna stvar je da se polifenoli mogu koristiti u kombinaciji sa standardnim kemoterapeutcima, povećavaju i osjetljivost tumorskih stanica i pritom štite i normalne stanice. Kombinacijom sa standardnim kemoterapeutcima flavanoidi su se pokazali izuzetno učinkoviti, značajno poboljšavaju i krajnji ishod liječenja malignih oboljenja.

## 2.2. FLAVANOIDI

Flavanoidi predstavljaju najveći u skupinu polifenola. To su sekundarni biljni metaboliti koji biljkama služe kao zaštita od parazita, oksidativnih oštećenja ili pak za zaštitu od teških klimatskih uvjeta. Kao takvi, flavanoidi se nalaze široko rasprostranjeno u hrani koja se svakodnevno konzumira. U najvećim koncentracijama flavanoidi se nalaze u slijedećim namirnicama: propolis, peršin, luk, borovnica, crni čaj, zeleni čaj, banana, tamna čokolada (sa sadržajem kaka 70% ili više) i dr. Pri obradi malignih oboljenja flavanoidi se koriste u kombinaciji sa standardnim kemoterapeutcima pri čemu značajno poboljšavaju ishod liječenja, ili se pak mogu koristiti pojedinačno pokazujući i izuzetnu antitumorsku aktivnost.

Jedan od glavnih problema pri korištenju kemoterapeutika je stvaranje rezistencije tumorskih stanica na korišteni kemoterapeutik. Istraživanja koja su rađena sa kamptotecinom, analogom irinotekana su pokazala slijedeće mehanizme rezistencije tumorskih stanica:

1. Stvaranje različitih enzima uključenih u konverziju irinotekana
2. Smanjena ekspresije topoizomerase I
3. Promjena strukture topoizomerase I kao posljedica velikog broja mutacija
4. Promjenjeni odgovor stanice na formirani kompleks kamptotecin –topoizomeraza I – DNA
5. Aktivacija transkripcijskog faktora, nuklearni faktor kappa B, oštećenje DNA i supresije posljedice apoptoze [40].

Međutim ukoliko se flavanoidi npr. iz propolisa kombiniraju sa irinotekanom postiže se aditivni ili čak sinergistički antitumorski učinak na osjetljivim Hep2 i vinkristin rezistentnim VK2 stanicama [40].

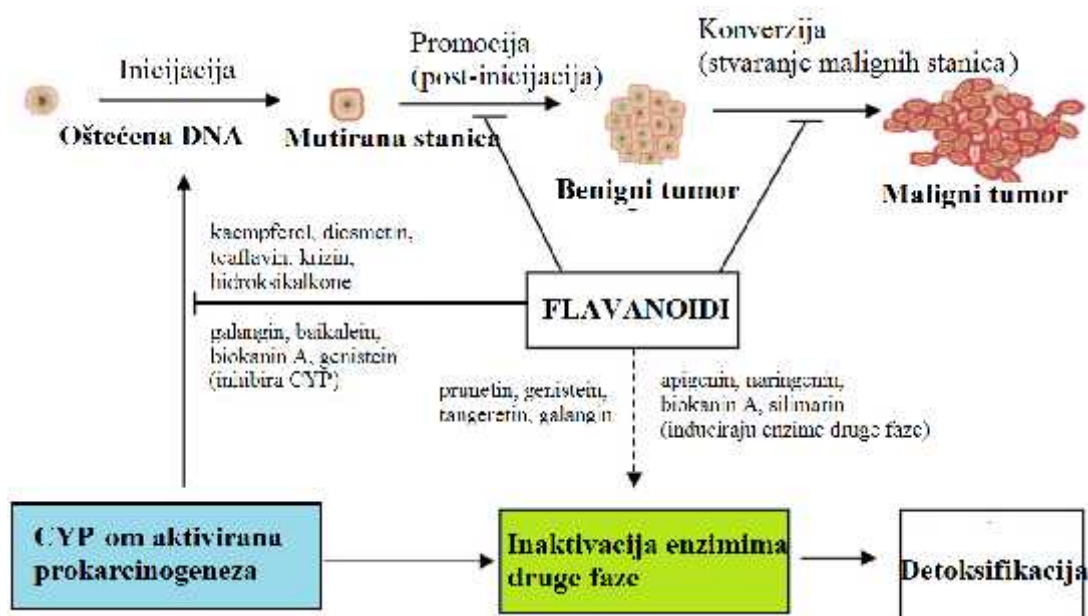
Rezultati pokazuju da je irinotekan manje učinkovit u usporedbi sa kombinacijom pripadnih flavanoida. Povećanje preživljenja modelnih organizama ukazuje da se irinotekan procesira različitim enzimima i pretvara u aktivniju formu SN-38, i za tu pretvorbu je potrebna karboksilesteraza. Jasna veza između karboksilesteraze i pretvorbe irinotekana u aktivniju formu je pokazana u stanicama raka pluća u kojima je rezistentnost na irinotekan bila puno veća ukoliko je koncentracija karboksilesteraze manja [41]. Iz ovih istraživanja [40] se pokazalo da je upotreba irinotekana sa flavanoidima puno učinkovitija zbog:

1. Sinergistički učinak flavanoida i kemoterapeutika na topoizomerazu I i II
2. Inhibicija tirozin kinazne aktivnosti
3. Smanjena transkripcija nuklearnog faktora kappa B
4. Stimulacija imunološkog sustava
5. Modulacija steroidnih hormona (fitoestrogenska aktivnost).
6. Inhibicija angiogeneze

Epirubicin koji je produkt bakterija roda *Streptomyces* ima sposobnost vezanje na DNA zaustavljajući i DNA polimerazu a samim tim i sintezu DNA. Kao takav često se koristi kao kemoterapeutik. Međutim njegova učinkovitost je puno veća ukoliko se koristi u kombinaciji s flavanoidima iz propolisa. Najveći sinergistički učinak flavanoida i epirubicina se postiže ukoliko se oni injiciraju nakon inokulacije tumorskih stanica. Međutim uočeno je da je učinak daleko manji ukoliko se epirubicin i flavanoidi injektiraju prije inokulacije tumorskih stanica. Mogući razlog tome je da antioksidativni potencijal flavanoida temeljen na

uklanjanju radikala kisika koje stvara epirubicin što smanjuje koncentraciju radikala i njihovo vezanje za DNA stanica tumora, čine tumorske stanice rezistentnijim na epirubicin [42].

Pored sinergističkog učinka koji se postiže kombinacijom flavanoida i pojedinih kemoterapeutika, flavanoidi su pokazali antitumorsku aktivnost (Slika 13) kada se koriste pojedinačno bez kemoterapeutika.



Slika 13. Antitumorski učinak flavanoida. (preuzeto iz [55])

### 2.2.1. Kvercetin

Smrt neurona uzrokovana oksidativnim stresom uključuje poremećaj funkcije mozga kod ljudi. Budući da je regeneracija živanih stanica izuzetno mala, to dovodi do kumulativnog učinka i u poznom periodu života oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom mogu prouzročiti bolesti poput Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i dr. Oksidativni stres je posredovan različitim kisikovim reaktivnim spojevima među kojima je najznačajniji vodikov peroksid. Kvercetin je pokazao neuroprotektivni učinak na oksidacijski stres prouzročen s  $H_2O_2$ . Učinak kvercetina istražen je u kulturi P19 neurona praćenjem vijabilnosti P19 stanica različitim testovima: test isključenja tripanskog modrila, MTT test, oslobađanje laktat dehidrogenaze (LDH) iz P19. Dobiveni rezultati su pokazali da kvercetin prisutnosti  $H_2O_2$  značajno povećava vijabilnost stanica i da je vijabilnost gotovo jednaka kontroli [44]. Vijabilnost stanica je također mjerena LDH testom u kojemu se mjeri oštećenje membrane odnosno otpuštanje unutastanične LDH. Rezultati su pokazali da

kvercetin štiti stanicu od oksidativnog oštećenja, smanjuju i oštećenje i propusnost membrane za LDH [44]. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da unos hrane bogate flavanoidima odnosno kvercetinom može djelovati preventivno na bolesti koje su povezane sa starenjem.

### **2.2.2. Krizin i naringenin**

Oksidativni stres može uzrokovati oštećenja koja dovode do različitih bolesti, jedna od njih može biti osteoporeza. Flavanodi poput krizina i naringenina su se pokazali kao tvari koji mogu smanjiti razinu oksidativnog oštećenja a samim tim i usporiti proces nastanka bolesti koje su povezane sa starenjem. Da bi se dokazao njihov učinak kao modelni organizami korišteni su štakori Y59. Štakori su obrađeni s kvercetinom, naringeninom i krizinom (100 mg/kg) neposredno nakon dodatka retinoidne kiseline (80 mg/kg) i indukcije gubitka koštane mase tijekom 14 dana u nizu [43]. Dan nakon zadnje obrade životinja analiziran je sadržaj i gustoća kostiju, sadržaj kalcija i fosfora u femuru, geometrijske i fizičke značajke kostiju, lipidna peroksidacija i razina glutaciona u jetri i bubrezima. U svim dobivenim rezultatima krizin, naringenin i kvercetin pokazali su da sprječavaju gubitak koštane mase. Njihov preventivni učinak potvrđen je na sve gore navedene parametre [43]. Ovi rezultati sugeriraju da pomenuti flavanoidi imaju preventivni učinak te da se hranom trebaju unositi svakodnevno jer mogu spriječiti nastanak skeletnih bolesti.

## ZAKLJUČAK

Za nastanak tumora potrebne su mutacije u opisanim onkogenima, tumor – supresorskim genima i microRNA genima. činjenica da se broj osoba s malignim oboljenjima iz dana u dan povećava govori o tome da je današnji način života uvelike odgovoran za povećanu frekvenciju mutacija a samim tim i nastanak tumora. Ako se sa druge strane uzme u obzir da je postotak izliječenih malignih tumora gotovo zanemariv, onda se čitava problematika tumora može najbolje opisati narodnom poslovice: „bolje spriječiti nego liječiti“. Mnogobrojna istraživanja pokazuju izuzetnu preventivnu moć brojnih biljnih metabolita. Stoga svakodnevna konzumacija hrane bogata polifenolima može umanjiti rizik od nastanka malignih oboljenja. Također se pokazuje da pored preventivnog učinka polifenoli pokazuju izravnu antitumorsku aktivnost, što daje nadu da bi ovaj za sada alternativni pristup u skorijoj budućnosti mogao postati glavni način liječenja malignih oboljenja.



- [1] Lodish. Molecular cell biology. 2000; 5<sup>th</sup> edition
- [2] Thomas N. S., and Leanne C. H. On the Origin of Cancer Metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis* 2013; 18(1-2): 43–73.
- [3] [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
- [4] Philip J. F. Clonal origin of human tumors. *Annual Review of Medicine* 1979; 30: 135-143.
- [5] Uma Devi P. Basics of carcinogenesis. *Health Administrator* 2005; 17(1): 16-24.
- [6] Carlo M., Croce M.D. Oncogenes and Cancer. *The new England journal of medicine* 2008; 358: 502-511.
- [7] <http://onkologija.hr/kako-nastaje-rak-dojke-uzroci/>
- [8] Marshall W. A., Steven H. R., Ming Y., and Robert M.M. Role of Proto-oncogene Activation in Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 1992; 98: 13-24.
- [9] Barbacid M. ras Genes. *Annual Review of Biochemistry* 1987; 56: 779-827.
- [10] Vogel U. S., Dixon R. A., Schaber M. D., Diehl R. E., Marshall M.S., Scolnick E. M., Sigal I. S., and Gibbs J. B. Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature* 1998; 335(6185): 90-93.
- [11] Linda M. B., and Chi V. D. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001; 20(40): 5595–5610.
- [12] Oppedal B.R., Oien O., Jahnsen T., and Brandtzaeg P. N-myc amplification in neuroblastomas: histopathological, DNA ploidy, and clinical variables. *Journal of clinical pathology* 1989; 42(11): 1148–1152.
- [13] Weiss W.A., Aldape K., Mohapatra G., Feuerstein B.G., and Bishop J.M. Targeted Expression of MYCN Causes Neuroblastoma in Transgenic Mice. *EMBO* 1997; 16 (11): 2985-2995.
- [14] Douglas R.G. and Guido K. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* 2004; 305(5684): 626-629.
- [15] Placzek W.J., Wei J., Kitada S., Zhai D., Reed J.C., Pelliccia M. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death & Disease* 2010; 1(5): 37-77.
- [16] Nakamura T., Canaani E., Croce C.M. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* 2007; 104(26): 10980–10985.
- [17] Eis P.S., Tam W., Sun L., Chadburn A., Li Z., Gomez M.F., Lund E., Dahlberg J.E. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* 2005; 102(10), 3627-3632.

- [18] Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., et al. "miR-15 And miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A 2005; 102(39): 13944–13949.
- [19] Jin-Tang D. Chromosomal Deletions and Tumor Suppressor Genes in Prostate Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2001; 20: 173-193.
- [20] James G. Herman. „Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer“. *Seminars in Cancer Biology* 1999; 9(5): 359–367.
- [21] Harris H., Miller O.J., Klein, G.P. and Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 1969; 223: 363-368.
- [22] Holland and Frei. *Cancer Medicine* 2009; 8<sup>th</sup> edition.
- [23] Moran E., Matthews M.B. Multiple functional domains in the adenovirus E1A gene. *Cell* 1987; 48: 177-178.
- [24] Dyson N., Howley P., Munger K., Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-937.
- [25] Oršoli N. Bee honey and cancer. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2009; 1(4): 93 - 103.
- [26] Simon A., Trayanor K., Santos K., Blaser G., Bode U., Molan P. Medical honey for wound care--still the latest resort. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2009; 6(2): 165-173.
- [27] Oršoli N., Baši I. Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. *Recent Progress in Medicinal Plants* 2006; 17: 55-113.
- [28] Rui H.L. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *Journal of Nutrition* 2004; 134(12): 3479-3485.
- [29] Walker P., Crane E. Constituents of propolis. *Apidologie*. 1987; 18: 327-334.
- [30] Matsuno T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Zeitschrift für Naturforschung Section C* 1995; 50: 93-97.
- [31] Kimoto T., Arai S., Kohguchi M., Aga M., Nomura Y., Micallefand M.J. Kurimoto M., and Mito K., Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection and Prevention*. 1998; 22: 506-515.
- [32] Oršolic N., Terzic S., Šver L., and Bašić I. Honey-bee products in preventive and/or therapy of murine transplantable tumors. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005; 85: 363-370.

- [33] Oršolic, N., S. Terzic, Ž. Mihaljevic, L. Šver and I. Bašić. Effect of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on the tumor formation and growth. *Biologica and Pharmaceutical Bulletin* 2005; 28(10): 1928-1933.
- [35] Oršolić, N., A. Knežević, L. Šver, S. Terzić, B. Hackenberger and I. Bašić. "Influence of honey bee products on transplantable murine tumors". *Veterinary and Comparative Oncology* 2003; 1(4): 216-226.
- [36] Bellelli L. and Sezzi M.L. C'3 participation in the rejection of some experimental tumors. *Oncology* 1976; 33: 215-218.
- [37] De La Harpe, J. and Nathan C.F. A semi-automated microassay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunological Methods* 1998; 78(2): 323-336.
- [38] Urban J.L., Shepard H.M., Rothstein J.L., Sugarman B.J., and Schreiber H. Tumor necrosis factor: a potent effecter molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* 1986; 83(14): 5233-5237.
- [39] Oršolić N., Anica H.K., Benković V., and Bašić I. Benefits of use of propolis and related flavonoids against the toxicity of chemotherapeutic agents. *Transworld Research Network* 2008; 223-250.
- [40] Oršolić N., Bevanda M., Bendelja K., Horvat-Knežević A., Benković V. and Bašić I. Propolis and related polyphenolic compounds; their relevance to host resistance and interaction with chemotherapy. *Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine*, 2008; 223-250.
- [41] van Ark-Otte J., Kedde M.A., van der Vijgh, W.J., Dingemans, A.M., Jansen, W.J., Pinedo, H.M., Boven, E., and Giaccone, G. Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells 1998 *British Journal of Cancer* 1998; 77(12): 2171-2176.
- [42] Scheller S., Krol W., Swiacik J., Owczarek S., Gabrys J., Szumilas J., Eckert L., and Shani, J. Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin. *Zeitschrift für Naturforschung* 1989; 44c (11-12): 1063-1065.
- [43] Oršolić N., Goluža E., Đikić D., Lisić D., Sašilo K., Rod E. Jele Ž., Maja V.L., and Orčić T. Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. *European journal of nutrition* 2013; 53(5): 1217-1227.
- [44] Maja J. J., Vuković L., Puhović J., Erhardt J., Oršolić N. Neuroprotective Effect of Quercetin Against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Injury in P19 Neurons. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012; 47(2): 286-299.
- [45] Ferreres F., Blázquez M.A., Gil M.I., and Tomás-Barberán F.A. Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography* 1994; 669: 268-274.
- [46] Todd F.E., and Vansell G.H. Pollen grains in nectar and honey. *The Journal of Economic Entomology* 35, 728-731, (1942).

- [47] Jaganathan S.K., and Mandal M. Honey constituents and its apoptotic effect in colon cancer cells. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science* 2009; 1(2): 29–36 (2009).
- [48] Saravana K.J., and Mahitosh M., Hindawi. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009; 2009 : pages 13.
- [49] Orsolic N., Knezevi A., Sver L., Terzi S., Hackenberger B.K., and Basi I. Influence of honey bee products on transplantable tumours, *Journal of Veterinary and Comparative Oncology* 4, 216–226, (2004).
- [50] Jaganathan S.K., and Mandal M. Honey constituents and its apoptotic effect in colon cancer cells. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science* 2009; 1(2): 29–36.
- [51] N. C. Cook N.C., and S. Samman S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry* 1996; 7(2): 66–76.
- [52] Catapano A.L. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* 1997; 48(1): 39–44.
- [53] K. Loku K., Tsushida T., Takei Y., Nakatani N., and Terao J. Antioxidant activity of quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995;1234(1): 99–104.
- [54] <http://healthimpactnews.com/wp-content/uploads/2014/05/Honey-Chart.png>
- [55] [http://bitchonabike.blogspot.com/2011\\_02\\_01\\_archive.html](http://bitchonabike.blogspot.com/2011_02_01_archive.html)